

## Note

---

### Recherche et dosage des molécules monocarbonées oxygénées dans les solutions glucosées stérilisées par la chaleur humide

LAURE MATCHOUTSKY, ERIC POSTAIRE, DOMINIQUE PRADEAU, PATRICE PROGNON ET MICHEL HAMON  
*Laboratoire de Contrôle de Qualité, Pharmacie Centrale des Hôpitaux de Paris, 7 rue du Fer à Moulin, F-75005 Paris (France) et Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, rue J. B. Clément, F-92290 Chatenay-Malabry (France)*

(Reçu le 25 novembre 1985; accepté sous forme révisée le 19 juin 1986)

La stérilisation par la chaleur humide des solutés glucosés a pour conséquence l'apparition systématique de nombreux produits de dégradation<sup>1-8</sup> et une acidification du milieu<sup>9-11</sup>. Dans ce contexte, le dosage spécifique du D-glucose par voie enzymatique est nécessaire. Par ailleurs, pour expliquer la diminution du pH qui se produit au cours de la stérilisation des solutés renfermant du glucose, nous avons pensé à une scission de la molécule de glucose ou de 5-hydroxyméthylfurfural avec dégagement de dioxyde de carbone, d'autant qu'une décarboxylation du 5-hydroxyméthylfurfural a déjà été proposée<sup>11</sup> en 1974. En outre, certains auteurs<sup>12</sup> attribuent à l'acide formique un rôle non négligeable dans le processus de l'acidification. Nous avons essayé de mettre en évidence la présence, après stérilisation, de dioxyde de carbone et d'acide formique dans les solutions glucosées à 50% (p/v) pures ou renfermant, en plus, de l'acétate de sodium (16,8% p/v) ainsi que dans une solution de 5-hydroxyméthylfurfural à 0,3 g/L (concentration maximale obtenue lors de la dégradation de solutions glucosées).

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Préparations des solutions glucosées.* — La solution de glucose à 50% a été obtenue par dissolution de D-glucose anhydre (Merck) dans l'eau distillée. La solution contenant l'acétate a été préparée en ajoutant à une solution de glucose à 50% (90 mL) de l'acétate de sodium (Merck) (16,8 g/10 mL d'eau distillée). Elle est donc à 45% en glucose. La solution de 5-hydroxyméthylfurfural a été préparée par simple dissolution de 0,6 g/L dans l'eau distillée. La répartition de ces solutions a été faite en flacons de verre de 125 mL, la fermeture des flacons a été réalisée avec des bouchons en élastomère puis sertis par des capsules métalliques. Ces flacons ont été stérilisés dans un autoclave horizontal ("Lequeux"), pendant 20 min à 120°.

*Méthodes d'analyse.* — Les mesures de pH ont été réalisées à l'aide d'un

pH-mètre Methrohm 632 à électrode de verre. L'étalonnage a été réalisé au moyen de tampons de pH 4 et 7. Le dosage du glucose a été réalisé par la méthode à la D-glucose oxydase avec détection à 505 nm par un spectrophotomètre Hewlett-Packard 8451 A.

Afin de mettre en évidence le  $\text{CO}_2$  et l'acide formique dans les solutions glucosées à 50% en glucose seul et renfermant de l'acétate de sodium à 16,8% et dans une solution de 5-hydroxyméthylfurfural à 0,6 g/L, nous avons mis au point une méthode simple, spécifique et sensible faisant appel à la chromatographie en phase gazeuse selon la technique de l'espace de tête.

Nous avons réalisé la détection après réduction totale de ces composés en méthane, les caractéristiques analytiques de cette méthode ont été décrites précédemment pour une étude de l'oxydation de diverses molécules organiques<sup>13</sup>. La séparation chromatographique est fonction de la taille de la molécule. CO est élué en premier, suivi par  $\text{CO}_2$ , puis par le formaldéhyde, le méthanol et l'acide formique. L'effluent est ensuite mélangé avec un excès de  $\text{H}_2$  puis l'ensemble est porté à une température de 350° au sein du four à méthanation. Les substances sont ainsi réduites séparément en méthane et détectées par ionisation de flamme.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Nous avons étudié 3 paramètres de dégradation: (a) Détermination de la concentration en glucose avant et après stérilisation; (b) mesure du pH avant et après stérilisation; (c) dosage des molécules monocarbonées. Il est à noter, que nous n'avons pu mettre en évidence ni acide formique, ni formaldéhyde, ni méthanol dans les solutions autoclavées.

À l'examen du Tableau I, nous remarquons une diminution importante du pH après stérilisation particulièrement pour les solutions renfermant de l'acétate de sodium. À l'examen du Tableau II, nous constatons une dégradation importante du glucose particulièrement pour les solutions comportant de l'acétate de sodium. Le dosage du dioxyde de carbone est réalisé par la mesure de la hauteur des pics obtenus par rapport à une gamme d'étalonnage. A l'examen du Tableau III, nous constatons une libération de dioxyde de carbone plus importante avec les solutés renfermant de l'acétate de sodium où apparaît une dégradation beaucoup plus poussée que dans les solutions pures de glucose.

Si nous n'avons pu isoler l'acide formique, nous avons pu montrer que le chauffage à 120° de solutions glucosées simples et d'une solution de 5-hydroxyméthylfurfural libère en plus du dioxyde de carbone, du monoxyde de carbone qui représente environ 20% de la concentration en dioxyde de carbone pour les solutions glucosées simples et 50% pour les solutions de 5-hydroxyméthylfurfural. La libération de monoxyde et dioxyde de carbone par une solution de 5-hydroxyméthylfurfural est la preuve que celui-ci n'est pas le produit de dégradation ultime du glucose et qu'il doit subir une décomposition ultérieure. Cette présence de monoxyde de carbone peut éventuellement être mise en parallèle avec l'isolement

TABLEAU I

MESURE DU pH AVANT ET APRÈS STÉRILISATION DE SOLUTIONS GLUCOSÉES À 120° PENDANT 20 MIN

<i>Produits</i>	<i>pH</i>		
	<i>Avant</i>	<i>Après</i>	<i>Différence</i>
Glucose 50% (p/v) ( <i>n</i> = 6)	4,64	4,26	0,38
Glucose 50% (p/v) et acétate 16,8% (p/v) ( <i>n</i> = 6)	7,69	5,73	1,96

TABLEAU II

DOSAGE DU GLUCOSE AVANT ET APRÈS STÉRILISATION À 120° PENDANT 20 MIN

<i>Produits</i>	<i>Concentration</i>			<i>Dégradation (%)</i>
	<i>Avant</i>	<i>Après</i>	<i>Diminution</i>	
Glucose 50% (p/v) ( <i>n</i> = 6)	522,58	487,53	35,05	6,7
Glucose 50% (p/v) et acétate 16,8% ( <i>n</i> = 6)	477,53	315,35	162,18	33,96

TABLEAU III

DOSAGE DU DIOXYDE DE CARBONE DANS DIFFÉRENTS ÉCHANTILLONS DE GLUCOSE<sup>a</sup> ET DANS UNE SOLUTION DE 5-HYDROXYMÉTHYLFURFURAL<sup>b</sup>

<i>Produits</i>	<i>Concentration en CO<sub>2</sub> (mmol/L)</i>
Glucose 50% (p/v) et acétate 16,8% ( <i>n</i> = 6)	6,17
Glucose 50% ( <i>n</i> = 6)	0,181
5-Hydroxyméthylfurfural ( <i>n</i> = 6)	0,086

<sup>a</sup>A 50% (p/v). <sup>b</sup>À 0,6 g/L.

d'acide formique par certains auteurs. En effet, à température élevée, l'acide formique se décompose en monoxyde de carbone et dioxyde de carbone<sup>14</sup> selon les Réactions (1) et (2).



Afin de savoir si la libération de dioxyde de carbone pouvait être responsable de la diminution de pH observé au cours de la stérilisation, nous avons considéré

que le dioxyde de carbone gazeux que nous avons dosé par chromatographie en phase gazeuse se trouvait à l'état de dioxyde de carbone dissous dans les solutions glucosées sous forme d'acide carbonique. La solubilité du dioxyde de carbone à 15° par litre d'eau est de 1 L sous 0,1 MPa (1 atm)<sup>15</sup>. La seconde acidité de l'acide carbonique (pKa 10,2) ne pouvant s'exprimer dans les conditions opératoires, on peut considérer que celui-ci se comporte comme un acide faible comme le confirme le pH voisin de 3,9 mesuré pour une solution aqueuse saturée de dioxyde de carbone dans l'eau (*c* 44 mmol/L). Si le dioxyde de carbone était entièrement dissous dans l'eau, nous obtiendrions les pH suivants, d'après l'Équation (3):  $[\text{CO}_2]$  6,17mm, pH 4,30 avec acétate;  $[\text{CO}_2]$  0,18mm, pH 5,07 sans acétate;  $[\text{CO}_2]$  0,086mm, pH 5,23 avec 5-hydroxyméthylfurfural. Pour les solutés ne renfermant

$$\text{pH} = 0,5 \text{ pKa} - 0,5 \log c \quad (3)$$

que du glucose, un pH de 4,26 mesuré après stérilisation peut être explicable puisque le pH initial de 4,64 indique déjà une légère acidification et que partant d'un pH théorique de 7 la libération de 0,18 mmol/L de dioxyde de carbone donnerait un pH de 5,07.

En revanche, dans le cas d'un soluté de glucose renfermant de l'acétate de sodium, nous obtenons 6,17 mmol/L de dioxyde de carbone et avec un pH initial de 7,69 nous arrivons à 5,73 (pH mesuré après stérilisation). A ce pH, la teneur en ion hydrogénocarbonate et donc en  $\text{H}^+$  est de 20% par rapport au dioxyde de carbone dissous. En effet, en appliquant l'équation de Handerson-Hasselbach, on obtient les Équations 4-6. La concentration initiale en acétate est de 2,04 mol/L.

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} \quad (4)$$

$$5,73 - 6,4 = \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} \quad (5) \quad \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = 0,2 \quad (6)$$

Il s'est formé, à pH 5,73, 0,2 mol d'acide acétique ce qui rend négligeable comparativement l'acidité apportée par les 6 mmol de dioxyde de carbone. A cela, il faut ajouter que la solubilité du dioxyde de carbone dans la solution de glucose stérilisée peut être un peu différente de la solubilité dans l'eau distillée. En particulier, la présence éventuelle d'acides fixes décrits dans la littérature (acides lévulinique, métagaccharinique, 5-hydroxyméthylfuroïque et 2,5-furannedicarboxylique) peut reculer l'ionisation donc la solubilité du dioxyde de carbone.

La mise en évidence d'une quantité de dioxyde et de monoxyde de carbone dans les solutions glucosées après stérilisation et la mesure du dioxyde de carbone et du monoxyde de carbone dans une solution de 5-hydroxyméthylfurfural nous permet de dire que le 5-hydroxyméthylfurfural n'est pas le produit ultime de la dégradation du glucose et que celui-ci doit subir une dégradation ultérieure. Dans le cas des solutés ne renfermant que du glucose, il est possible de considérer que la dissolution du dioxyde de carbone est pratiquement totale et que la formation

d'acide carbonique joue un rôle important dans l'acidification au cours de la stérilisation de ces solutés. En revanche, dans les solutés renfermant des ions acétate, la participation du dioxyde de carbone à l'acidification est certainement moins nette compte-tenu de la formation d'acides fixes décrits dans la littérature (acides, lévulinique et saccharinique).

## RÉFÉRENCES

- 1 R. B. TAYLOR, B. M. JAPPY ET J. M. NEIL, *J. Pharm. Pharmacol.*, 23 (1971) 121-129.
- 2 E. F. L. J. ANET, *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960) 1502-1503.
- 3 P. BELLENGER, M. C. GUELFY ET M. HAMON, *Actual. Pharm. Biol. Clin.*, 1 (1981) 263-267.
- 4 D. G. DURHAM, C. T. HUNG ET R. B. TAYLOR, *Int. J. Pharm.*, 11 (1982) 31-40.
- 5 K. R. HEIMLICH ET A. N. MARTIN, *J. Am. Pharm. Assoc.*, 49 (1960) 592-597.
- 6 C. T. HUNG, A. B. SELKIRK ET R. B. TAYLOR, *J. Clin. Hosp. Pharm.*, 7 (1982) 17-23.
- 7 N. E. WEBB, G. J. SPERANDIO ET A. N. MARTIN, *J. Am. Pharm. Assoc.*, 47 (1958) 101-103.
- 8 W. T. WING, *J. Pharm. Pharmacol.*, 12 (1960) 191T-196T.
- 9 R. J. STURGEON, N. K. ATHANIKAR, H. A. HARBISON, R. S. HENRY, R. W. JURGENS ET A. D. WELCO, *J. Parenteral Drug. Assoc.*, 34 (1980) 175-182.
- 10 R. B. TAYLOR ET V. C. SOOD, *J. Pharm. Pharmacol.*, 30 (1978) 510-511.
- 11 A. M. TAHIR ET D. M. CATES, *Carbohydr. Res.*, 34 (1974) 219-261.
- 12 H. P. TEUNISSEN, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 49 (1930) 784-826.
- 13 E. POSTAIRE, J. E. HILA, A. ASSAMOÏ, D. PRADEAU, C. DAUPHIN ET M. HAMON, *Analisis*, 13 (1985) 463-469.
- 14 C. N. HINSHELWOOD ET H. HARTLEY, *J. Chem. Soc.*, 123 (1923) 1333-1334.
- 15 M. WINDHOLZ, S. BUDAVARI, R. F. BLUMETTI ET E. S. OTTERBEIN, *The Merck Index*, 10ème éd., Merck and Co., Inc., Rahway, 1983, p. 251.